INRA _ Département de ZOOLOGIE

Station de Montfavet

P4228

I. N. R. A.
SERVICE DE DOCUMENTATION
25. OCT. 1982
UNITE CENTRALE DE VERSAILLES

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITÉS

DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

Année : 1973

Vol. 2

Michel BOUNIAS.

INRA - Département de Zoologie
Station de Montfavet
Laboratoire de Biochimie

Janvier 1974

COMPTE RENDU D'ACTIVITÉS DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE pour l'Année 1973 -

Michel BOUNIAS

SOMMAIRE :

I - INTRODUCTION

II - ORGANISATION ET AMÉNAGEMENT DU LABORATOIRE

III - EQUIPEMENT ET PROGRAMMES -

IV - RÉSULTATS -

A - Programme Protéines :
1) Protéines de l'Hémolymphe (Abeille) -
2) Entomoprotéines en Nutrition Animale -

B - Métabolites libres : Relations Insectes / Milieux Artificiels d'Elevage -
1) Métabolites libres de l'Hémolymphe des insectes phytophages -
2) Métabolites libres dans les milieux d'élevages artificiels -
3) Relations entre l'insecte et le milieu nutritif -

C - Rôle biochimique de certains facteurs du Développement -

D - Collaborations extérieures :
1) Analyse des Miels et Miellats - Contrat EDF
2) Autres interventions -

V - PROGRAMMES NOUVEAUX POUR 1974

1) Au niveau de la Station de Zoologie -
2) Au niveau de la Station d'Apiculture -
3) A l'échelle du Département -

VI - DISCUSSION -
A - Difficultés rencontrées
B - Bilan Budgétaire 1973 - Budget 1974 -

VII - CONCLUSION -

.../...

INTRODUCTION

Le laboratoire de Biochimie a vu le jour au début de l'année 1973, et s'est trouvé immédiatement confronté avec plusieurs problèmes qui se posaient à court terme, tant à la Station de Zoologie qu'à celle d'Apiculture.

Son installation et son organisation ont donc été conçues dès le départ en vue d'aborder des questions aussi différentes que : les sucres du miel, les vitamines dans les milieux d'élevage et les protéines de l'hémolymphe, avec un maximum d'efficacité et de rapidité.

ORGANISATION et AMÉNAGEMENT du LABORATOIRE.

Les locaux, très obligeamment mis à la disposition de l'Unité par la Station d'Apiculture, comprennent deux pièces principales : l'une avec Sorbonne, destinée aux manipulations chimiques et l'autre réservée aux appareillages de mesures physiques. Un petit local a été aménagé en "salle de chromatographie"; les appareils à distiller et autoclaves se trouvent dans une pièce séparée.

Des paillasses supplémentaires ont été fabriquées sur place; un stock de produits chimiques a été constitué dans une optique qualitative : large échantillonnage pour des besoins variés, mais une quantité minimum pour chaque produit; l'équipement en verrerie a été en grande partie complété.

Le fichier central du laboratoire comporte 3 sections : la section Produits Chimiques avec 1 fiche pour chaque produit (Marque, Réf., pureté, quantité, lieu de stockage, état du stock + Formule et P.M.); la section verrerie et appareils comporte une fiche pour chaque pièce (avec indication des pertes ou détériorations éventuelles); enfin, le fichier "Recettes" s'enrichit progressivement de toutes les formules et préparations courantes mises en œuvre au laboratoire. Un poste fixe de travail a dû être prévu pour chaque type de technique; afin d'éviter toute perte de temps.

.../...

EQUIPEMENT ET PROGRAMMES.

L'équipement acquis en 1973 comporte essentiellement : les centrifugeuses, un enregistreur pour spectrophotomètre, un Photomètre-enregistreur et un Chromatographe en phase vapeur (sans ses accessoires, pour l'instant).

Les dépenses correspondantes figurent dans le chapitre budgétaire. (A noter, que la somme prévue en 1973 pour le collecteur de fractions et le broyeur d'organes a été consacrée, pour une grande part, au complément d'achat du Chromatographe).

Aménagement Electrique. Les deux pièces principales du laboratoire ont été équipées d'une installation électrique normalisée indépendante, sous la forme de rails "Canalis", qui allient une grande souplesse d'emploi à une remarquable sécurité.

Programmes.

En définitive, 8 sujets de travaux avaient été définis au cours du premier trimestre 1973 : 6 ont été abordés sur le plan expérimental et 2 sont à l'étude (E)

- Protéines de l'Hémolymphe chez l'Abeille (Génétique et Ecologie Biochimiques)
- Protéines des insectes phytophages (utilisation en Nutrition Animale)
- Métabolites libres dans l'Hémolymphe des Phytophages (Métabolisme/Nutrition)
- Métabolites libres dans les milieux d'élevage (Nutrition)
- Rôle biochimique de la vitamine C chez les phytophages (biochimie/Nutrition)
- Analyse des miels et miellats (contrat EDF - Ecologie biochimique)
- (E) Comparaison biochimique des races de noctuelles (Ecophysiologie-biochimique)
- (E) Identification et rôles des lipides chez les noctuelles migratrices (Energétique biochimique)

Une indication des publications qui pourraient être tirées de ces travaux, à court et moyen terme, (compte tenu des résultats déjà acquis), sera donnée à la fin des paragraphes concernant chaque sujet, dans le chapitre suivant consacré aux RÉSULTATS.

.../...

RESULTATS.

A - Programme Proteines

1) - Proteines de l'Hémolymphe chez l'Abeille -

La composition en proteines de l'hémolymphe a été analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide aux divers stades du développement (Larves, nymphes, adultes), chez les Abeilles de races noire, Caucasienne et Carnica (ouvrières, mâles et reines). Sur l'ensemble, une quinzaine de groupes protéiques différents ont été séparés.

Les premiers résultats ont fait apparaître quelques différences entre races, surtout chez les larves et nymphes. Ceci devra être confirmé et approfondi au cours de la campagne 1974.

Des possibilités de polymorphisme ont été également mises en évidence chez l'Abeille noire : ouvrières d'Hiver et mâles (haploïdes). Ceci devrait permettre le démarrage d'un programme de génétique biochimique débouchant sur une étude de génétique des populations chez l'Abeille (projet de thèse de M. Cornuet).

Les premiers essais de cinétiques d'action enzymatique (Phospho-hydrolases alcalines) ont été positifs et se poursuivront avec la recherche d'isoenzymes étendue aux phosphatases, estérases et oxidases, en vue de recherches débouchant ~~de~~ une part sur la nutrition et le métabolisme des insectes phytophages et d'autre part sur l'analyse du polymorphisme chez l'Abeille (et peut-être également chez les noctuelles)

Ces travaux nécessiteront vraisemblablement une période de mise au point de l'ordre de 1 an.

- Projet de Publication

« Comparaison des spectres protéiques de l'Hémolymphe chez quelques races d'Abeilles, au cours du développement » Echéance : Automne 1974 environ -

2) Utilisation éventuelle d' "Entomoprotéines" en Nutrition Animale.

L'analyse des protéines (déjà entreprise chez l'Abeille dans un but différent) a également débuté chez Chilo suppressalis dont l'hémolymphe paraît très riche à tous les stades du développement, plus particulièrement les larves et les nymphes. Ce travail va se poursuivre en 1974 chez les divers phytophages susceptibles d'être produits en masse dans des conditions économiques, sous trois angles définis :

- Détermination quantitative des protéines totales par unité de poids d'insecte.
- Caractérisation des classes de protéines (mobilité électrophorétique et Poids moléculaire)
- Composition en amino-acides (Structure primaire)

Pour chaque cas, les méthodes de travail ont été établies par des travaux préliminaires.

Si la nécessité s'en faisait sentir, une évaluation de la "valeur biologique" de ces protéines pourrait être obtenue au laboratoire, par exemple chez le rat, au moyen d'un élevage limité.

B. Métabolites libres. Relations Insectes ↔ Milieux nutritifs.

1) Métabolites libres de l'Hémolymphe des Phytophages.

Amino-acides et sucres libres ont été analysés chez l'Abeille et chez quelques lépidoptères (Chilo et Laspereysia).

Chez l'Abeille, la composition en amino-acides libres est caractérisée par une dominante en Proline et en composants basiques. Parmi les sucres libres, chez l'Ouvrière d'été, les 3 principaux sont le tréhalose, à forte concentration, puis le glucose et le fructose. L'Hiver, les sucres sont moins concentrés mais plus nombreux : il apparait, en effet, un polyholoside de réserve (glycogène ou apparenté), un diholoside proche du tréhalose, du saccharose ainsi qu'un pentose, venus s'ajouter aux précédents.

Chez les lépidoptères, le glucose et le fructose ne sont présents

.../...

qu'en très faibles concentrations ; le tréhalose est le plus abondant (Chilo suppressalis) et des polyholosides "lourds" (type glycogène) sont mis en évidence (~~comme~~ chez l'Abeille d'Hiver) - Les noctuelles ont une hémolymphe très pauvre en sucres libres de type hexoses et diholosides, de même que les carpocapses -

Les lépidoptères (larves stades IV à VI) ont une hémolymphe assez riche en amino acides basiques, selon les premières analyses -

L'intérêt de ces travaux porte non seulement sur les questions de nutrition, mais aussi sur d'autres applications telles que l'amélioration des méthodes de cultures de tissus (liaison avec M. VAGO) -

Projet de Publication :

"Comparaison de la composition ~~en~~ métabolites libres (Glucides et Amino Acides) de l'Hémolymphe de plusieurs insectes phytophages" -

Délai prévu : Juin-Juillet 74 env.

2) Métabolites libres dans les Milieux d'Elevages Artificiels

Le milieu artificiel d'élevage utilisé à la Station de Zoologie par Madame GUENNELON, en particulier (*), contient au moins 7 sucres principaux, parmi lesquels ont été identifiés : Raffinose, Maltose, Saccharose, Glucose et Fructose -

Le vieillissement du milieu entraine, en même temps que son oxydation, d'importants phénomènes d'hydrolyse (diminution du saccharose, au profit du glucose et du fructose) et la disparition totale d'un pentose (ou furanose) -

Ce mécanisme est en voie d'étude systématique - Il est à signaler que le pH des milieux (voisin de 4,45 au début) varie très peu avec le temps (pH 4,40 à 40 jours) mais augmente constamment de 0,2 unités en moyenne quand les larves sont présentes, ainsi que dans les excréments -

(*) Milieu "Chilo" type Drgg et apparentés.

.../...

3) Relations entre l'insecte et le milieu nutritif.

L'analyse des excréments de C. suppressalis montre, à égalité de poids sec avec le milieu nutritif, une richesse assez importante en glucides libres (glucose et fructose principalement) qui paraissent donc, en première hypothèse, transiter sans être dégradés. L'étude de ce phénomène va être approfondie, son incidence sur la composition des milieux pouvant être importante.

Projet de Publication

« Quelques aspects de la nutrition glucidique chez C. suppressalis en élevage sur milieu artificiel - Influence du vieillissement des Milieux ». Echéance prévue : Mai-Juin 1974.

C. Rôle biochimique de certains facteurs du Développement

1) Etude de la Vitamine C (Acide ascorbique).

La vitamine C subit, dans les milieux nutritifs, une dégradation dont la vitesse est proportionnelle à la température d'élevage, et la cinétique d'oxydation de l'acide ascorbique en fonction de la durée de stérilisation du milieu à l'autoclave est moins rapide qu'on ne le croyait généralement.

La présence de larves dans les milieux tend à accélérer l'oxydation de la vitamine C, tandis que l'activité réductrice résiduelle de l'acide ascorbique dans les excréments paraît augmenter en fonction de l'âge larvaire.

Une étude chimique de la transformation de l'acide ascorbique en son dérivé oxydé : l'acide déhydro-ascorbique (qui n'est plus vitamine) a permis d'aborder l'étude du mode d'action biochimique de la Vitamine C : d'une part chez le Carpocapse, en liaison avec

.../...

Madame IVALDI et d'autre part, chez Chilo, en liaison avec Madame GUENNELON. Le premier objectif de ce travail est de déterminer dans quelle mesure le développement des larves peut se poursuivre quand la vitamine C est pré-oxydée dans le milieu (sachant que les larves agées se développent en fait sur un milieu où toute la vitamine a disparu et que les jeunes larves ne se développent pas en l'absence de vitamine C). Les premiers résultats semblent plaider en faveur d'une utilisation possible de l'acide déhydro-ascorbique par les jeunes larves de Carpocapse.

L'oxydation catalytique in vitro de la vitamine C telle qu'elle est connue par la littérature n'a pu être appliquée dans le cas des solutions "concentrées" nécessaires pour la préparation des milieux : en effet, nous avons pu démontrer que les cinétiques d'oxydation dépendent de la concentration du produit et une méthode d'oxydation ménagée par le péroxyde d'hydrogène en milieu tamponné a été mise au point.

Publications prévues :

« Oxydation de la Vitamine C dans les milieux nutritifs destinés à l'élevage artificiel de Lépidoptères phytophages » Echéance : Février 74

« Rôle de l'acide déhydro-ascorbique sur le Développement des larves de Lépidoptère en élevage sur milieu artificiel ». Echéance : Mars-Avril 1974.

Enfin, l'influence du "contenant" sur l'oxydation des milieux fait l'objet d'analyses de contrôle chaque fois que cela est utile.

2) Autres facteurs vitaminiques.

L'étude d'autres facteurs de croissance est envisagée et fait l'objet de recherches préliminaires visant à l'élaboration de nouvelles méthodes de micro-analyse quantitative.

.../...

D. COLLABORATIONS EXTÉRIEURES.

1) Analyse des miels et miellats.

Une étude préliminaire des spectres glucidiques dans les miels et miellats a permis de définir quelques critères de distinction tels que le rapport $\frac{\text{Glucose}}{\text{Fructose}}$, la teneur totale en polyholosides et le rapport : $\frac{\text{hexoses}}{\text{Polyholosides}}$.

Par suite, et dans le cadre d'un contrat INRA/EDF, un ensemble de 40 échantillons de miels et miellats (29 Français et 11 allemands) ont été analysés par chromatographie quantitative en couche mince (en attendant que l'équipement C.P.G. soit complété). Le dépouillement des résultats est en cours.

Publication prévue.

"Comparaison de la composition glucidique de miels et miellats de différentes origines." Echéance : Mars 74.

2) Autres interventions.

Diverses demandes d'aides ou de conseils ont été, par ailleurs, accueillies au laboratoire dès 1973. Nous nous bornerons, pour l'instant, à mentionner l'analyse des glucides d'extraits de fruits en liaison avec la Station d'Agronomie (Madame HUGUET).

.../...

PROGRAMMES NOUVEAUX POUR 1974 -

1) Au niveau de la Station de Zoologie -

Au cours du prochain trimestre, une étude portant sur les noctuelles devrait être entreprise en liaison avec M. CAYROL, sous deux aspects, pour lesquels les méthodes de travail ont déjà fait l'objet d'une préparation précise :

a) Comparaison biochimique des races migrantes et sédentaires -

Tous les critères déjà analysés chez d'autres insectes (protéines, enzymes, métabolites libres) pourront être examinés comparativement chez les races présentant un intérêt écophysiologique particulièrement important -

b) métabolisme énergétique chez les espèces migratrices -

L'énorme dépense d'énergie mise en œuvre au cours des migrations présente un intérêt considérable ; l'identification des métabolites de réserve et leur mode d'utilisation devraient être abordés dès que possible -

Nota : L'étude des méthodes de séparation des lipides a fait l'objet de deux déplacements à l'Université de LYON - les analyses pourront être effectuées par Chromatographie en Phase Gazeuse lorsque l'équipement sera devenu Operationnel (en principe dès le 2e Semestre 74) -

2) Au niveau de la Station d'Apiculture -

Le programme initial portant sur la comparaison de races d'Abeilles au moyen de critères biochimiques, en vue d'aboutir à la différenciation des écotypes va devoir être élargi plus tôt que prévu, du fait de l'arrivée de M. Cornuet. Le travail de recherches systématiques sur l'évolution des spectres protéiques en fonction des stades du développement sera poursuivi, tandis que les aspects ultérieurs concernant le polymorphisme biochimique feront l'objet d'études approfondies dès cette année, en espérant

.../...

que l'expérience précédemment acquise permettra d'éviter trop de tâtonnements. La recherche d'iso-enzymes constituera la base de ce travail dont la progression pourrait comporter deux phases : la première (objectif : diplôme de 3e cycle de M. CORNUET) aboutissant à la mise au point de l'instrument génétique : déterminisme génétique des phénomènes de polymorphisme mis en évidence, de préférence à l'aide de critères biochimiques originaux ; (Durée : 2 à 3 ans). La deuxième phase devrait aboutir à l'exploitation des résultats précédents au cours d'une étude sur la génétique des populations d'Abeille pouvant rejoindre la question des écotypes.

Dans le cadre de la recherche de critères biochimiques, une étude des pigments oculaires de la famille des ptérines sera engagée dès le début de 1974.

3) A l'Echelle du Département

Au cours de 1974 devrait être mis en route un projet de Recherches sur la biochimie des Pucerons, intéressant plusieurs Stations du Département : Rennes (MM. DEDRYVER et ROBERT) Bordeaux (M. MASSONIÉ) et Antibes (M. FERRAN), travaillant séparément dans des optiques différentes (parasitisme, nutrition...).

Il pourrait s'agir là du cas favorable où les divers problèmes posés relèvent de solutions biochimiques impliquant des méthodes de travail comparables, en particulier la micro-analyse des métabolites de l'hémolymphe, qui constitue un sujet déjà abordé, pour d'autres insectes, par l'Unité de Biochimie.

.../...

DISCUSSION.

A - Difficultés rencontrées

① Questions techniques - Etant exclus les problèmes budgétaires, parmi les difficultés rencontrées en 1973, deux méritent d'être mentionnées : la première est l'arrêt inopiné de fabrication des supports chromatographiques (phase solide pour couches minces) du type : Polycarbonate de Diphényl-propane, par Eastman-Kodak ce produit constituait l'un des éléments de base des microtechniques d'analyse quantitative des amino-acides et des sucres, dont la mise au point, acquise depuis des années, avait encore été améliorée au cours du dernier trimestre 1973.

De nouvelles méthodes sont en cours d'élaboration, en remplacement, mais leur étude risque de demander quelques mois de travail supplémentaire (certaines publications nécessitant encore quelques vérifications pourront être un peu retardées).

Cependant, dès fin 1974 - début 1975, l'équipement de Chromatographie en Phase Gazeuse, devenu opérationnel, apportera également dans ce domaine, une élégante solution de secours (bonne précision et grande sensibilité).

• Un autre problème se pose périodiquement au laboratoire : il s'agit des coupures d'eau ou d'électricité sans préavis suffisant (au moins plusieurs heures) voire même sans préavis du tout. Il est important de souligner que ceci peut entraîner des accidents matériels graves (inondations, et incendies), la détérioration d'appareils coûteux, et souvent la perte d'un travail qui a pu demander plusieurs jours de préparation (extraits en voie de purification, d'électrophorèse etc...)

② Questions de Personnel - Il ne s'agit pas encore tout à fait d'un problème. Il est à préciser, au contraire, que l'extension des programmes et les résultats déjà acquis l'ont été grâce à l'aide technique à temps pratiquement complet de Mme PARIS et M. GONNET, qui continuent à acquérir progressivement (et de manière fructueuse) la formation nécessaire dans le domaine des techniques biochimiques.

Cependant, l'équipe travaille d'ores et déjà à un rythme

.../...

très proche de la saturation, et compte tenu de la progression actuelle des Recherches, l'adjonction d'un technicien supérieur (niveau IUT) serait sans doute souhaitable à brève échéance, de même que le maintien d'une personne chargée de l'entretien et du nettoyage (du matériel spécialisé comme des locaux).

L'heure n'est pas pour autant au pessimisme : un effort soutenu de travail conjugué avec une organisation très rigoureuse devrait permettre, pour 1974, de résoudre les problèmes posés dans des délais relativement satisfaisants. Passée la première année durant laquelle toutes les questions ont dû être attaquées de front, il est possible qu'à titre d'essai, des périodes de un à plusieurs mois soient successivement réservées, maintenant, à un meilleur approfondissement de chacun des différents sujets en cours d'étude.

B. Bilan Budgétaire 1973 et Prévisions pour 1974.

Le tableau détaillé des dépenses engagées en 1973 est présenté à la page suivante (Tableau II).

Le tableau ci dessous donne une indication de l'évolution globale de 1972 à 1974

Tableau I. Bilan global comparé pour 1972. 1973 et 1974 (prévisions)

catégorie de dépense :	année 1972	Année 1973	Année 1974 (Prévisions.)
Matériel d'Equipement...	5602,17	51 553,20	22 000
Matériel de Fonctionnement...	1 476,13	10 268,97	5 400
Produits chimiques....	240,58	4 157,06	2 800
Bibliothèque	456,00	1 343,30	2 000
Fournitures de Bureau...	450,00	530,00	200
Immobilier	≃ 100,..	5 022,48	200
Total.....	8 324,88	72 876,07	32 600

Quelques mots de Plaidoirie. Ce budget a représenté, il est vrai, une charge relativement lourde au sein du Département ; il s'agit cependant de frais d'installation, souvent plus élevés que le roulement annuel ultérieur. De plus, il n'est pas inutile de souligner que les travaux ainsi entrepris avec un peu plus de 70000 F et grace à l'expérience apportée par 8 années de Recherches Biochimiques, pourraient être comparés sans honte à des programmes équivalents, du point de vue analytique, mais dont la mise en oeuvre a nécessité, dans d'autres Organismes de Recherche, un budget initial supérieur à 270 000 F, toutes choses égales par ailleurs.

Tableau II - Bilan détaillé des dépenses engagées pour l'Unité de Biochimie en 1973 - (*)

Catégorie de Dépense :	Origine des crédits : St. ZOOLOGIE	St. APICULTURE	DIVERS	Total
EQUIPEMENT : (Total 1973)...	36 613,20	(1972)	14 940,00 (1)	51 553,20
FONCTIONNEMENT :				
Produits chimiques...	3558,52	598,54	-	4 157,06
Matériel de Labo	2598,10	7 082,87	588,00 (2)	10 268,97
Bibliothèque (3)	527,80	816,50	-	1 343,30
Fournitures	480,...	50,...	-	530,...
Aménagement Immobilier	1 218,12	1 368,12	2436,24 (4)	5 022,48
Total Fonctionn^t	8 382,54	9 916,03	3024,24	21 322,81
Total (**) Général : ...	44 995,74	9 916,03	17 964,24	72 876,07

(1) Financement E.D.F. -

(2) Fourniture M.B. personnelle -

(3) Non compris les tirages Xérox de publications

(4) Prise en Charge par les Services Généraux

(*) Bilans établis sous réserve de modifications de détails dues aux retards de facturations etc...

(**) Non compris les frais de missions - (de l'ordre de 1600 F)

.../...

CONCLUSION.

Il semble raisonnable de penser, après un an d'activité, que l'Unité de Biochimie pourra progressivement accueillir les demandes de collaboration émanant de divers points du Département de Zoologie, en particulier grace à un travail préalable de synthèse et de regroupement des sujets pouvant relever de solutions communes au niveau biochimique.

Les thèmes de Recherche ainsi abordés présentent le double avantage d'être, d'une part, directement impliqués dans des domaines d'interêt agronomique immédiat (Sélection Apicole, nutrition et élevage de phytophages nuisibles en vue de préparer la lutte etc..) et de constituer, d'autre part, presque autant de voies directes d'accès vers une meilleure connaissance de la Biochimie Fondamentale des insectes, ce qui promet d'être tout à la fois passionnant, astreignant et enrichissant !!...

PUBLICATIONS EN COURS

① ZOOLOGIE et BIOCHIMIE ANIMALES

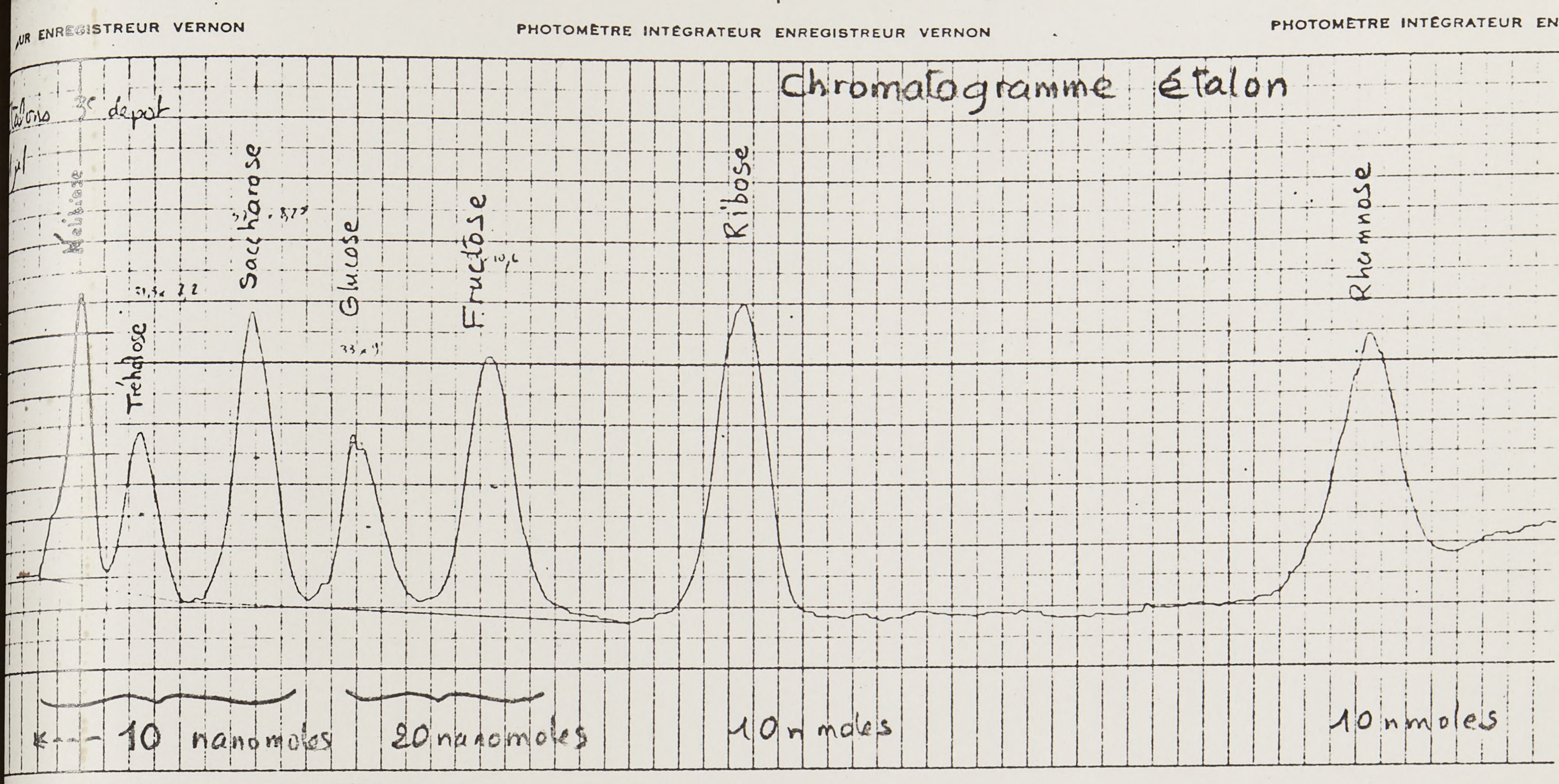
- « La Pyrale du Riz, Chilo suppressalis (WLK) : Mise au point Bibliographique » (450 Réf.) - Proposé pour : Bull. I.R.A.T.
- « Influence de la Toxine du Bacillus thuringiensis sur le Développement des larves de Chilo suppressalis (WLK) en élevage sur milieu artificiel » Proposé pour : Entomophaga
- « Oxydation de la vitamine C dans les milieux destinés à l'alimentation artificielle des Insectes Phytophages » - Proposé pour Annales INRA (Nutrition)

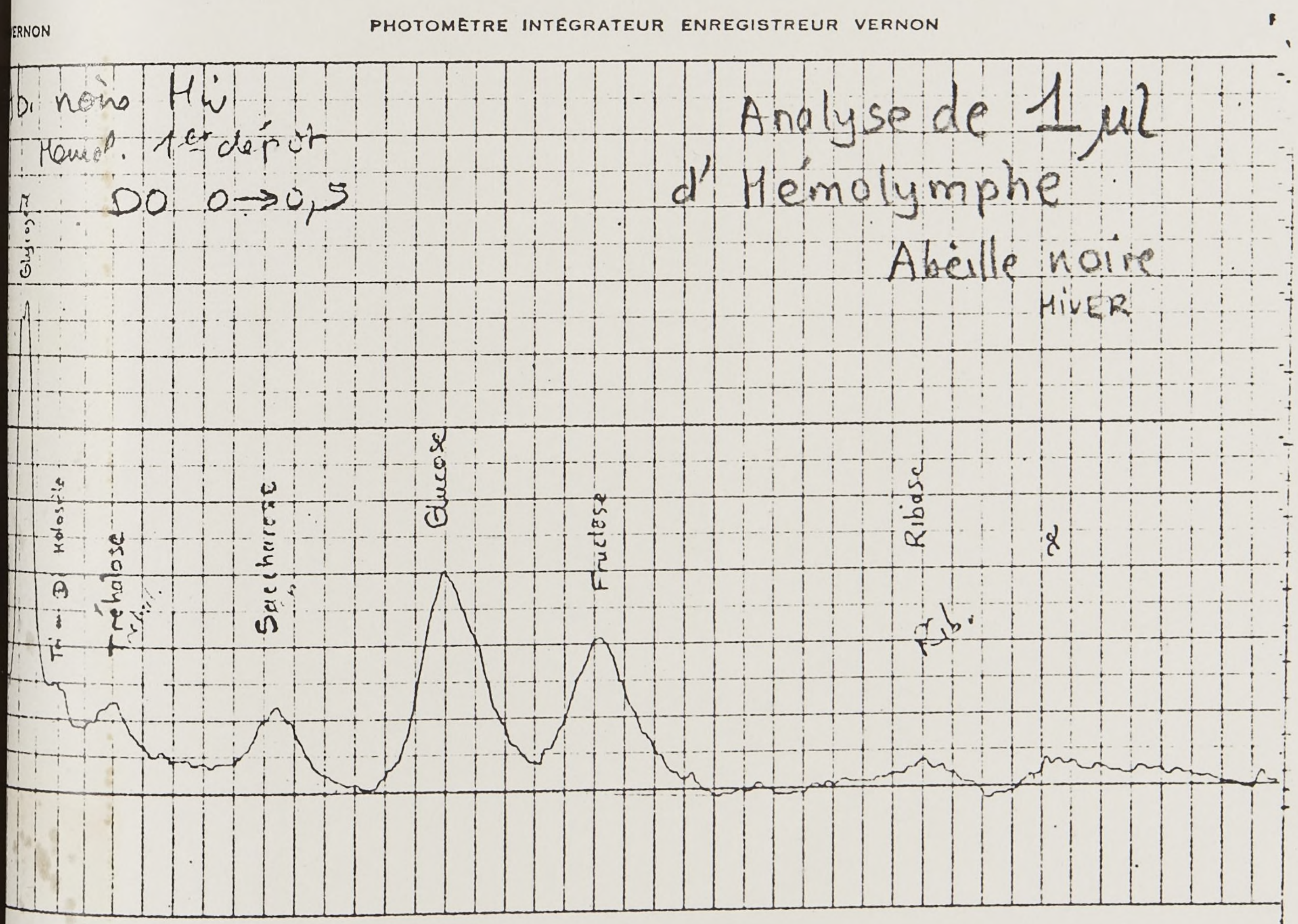
② BIOCHIMIE VÉGÉTALE

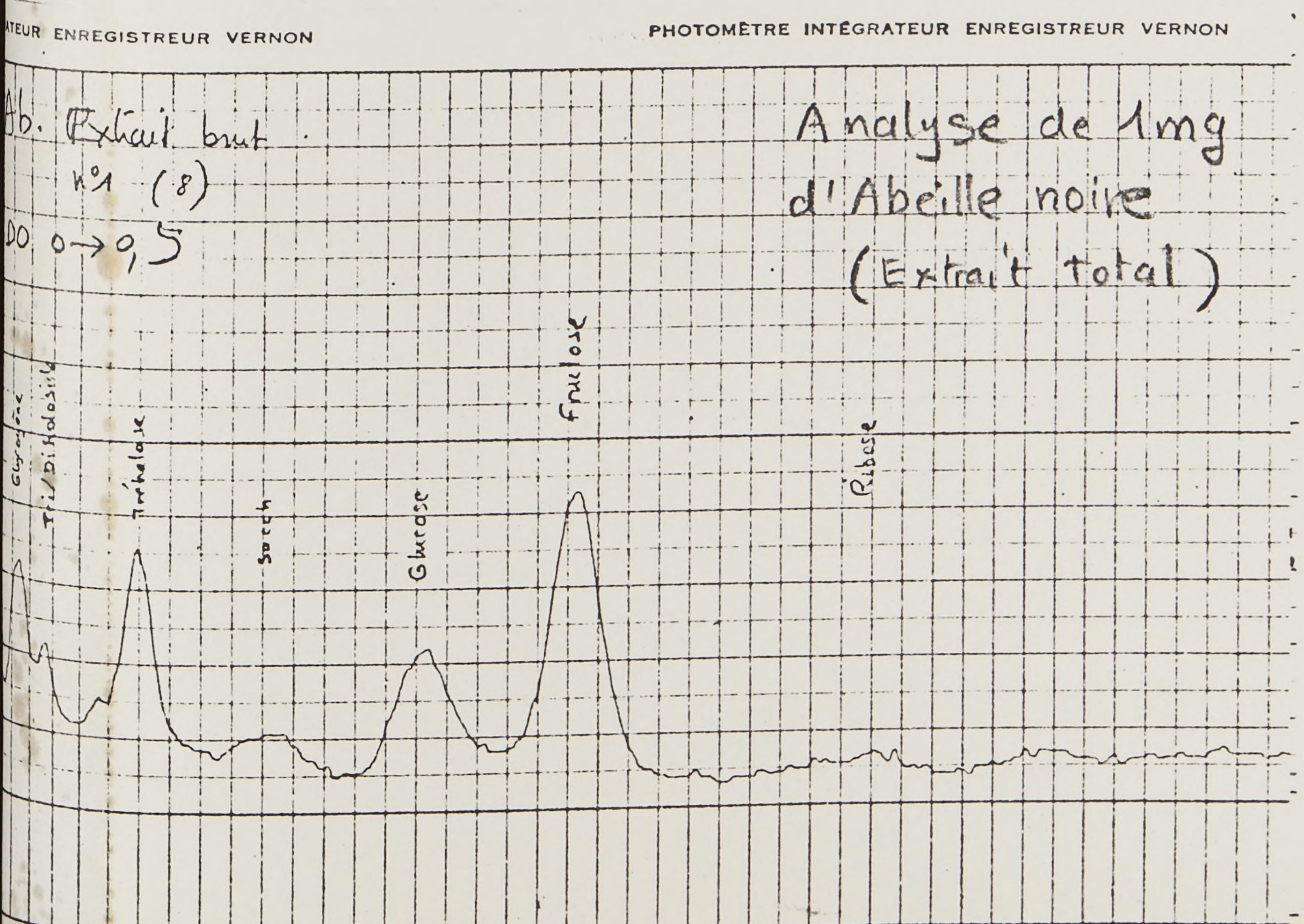
- 6 titres nouveaux parus en 1973
- 5 manuscrits soumis en 1974 -

+2 projets en préparation

Montfavet - Janvier 1974







ETUDE DES GLUCIDES CHEZ L'ABEILLE

(Race Noire)

Réduction $\frac{1}{2}$